UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

226

O. VERONA

Sullo stato di fase di AZOTOBACTER CHROOCOCCUM Beij

Estratto dagli ANNALI DI MICROBIOLOGIA - Fascicolo IV - V - VI
Vol. III - Dicembre 1747.

2 NOV. 1958

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

ANNALI
DI
MICROBIOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA AGRICOLTURA ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI; DI ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO RAPPORTI CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

T. CASTELLI, Perugia - G. DE ROSSI, Perugia - V. PEGLION, Bologna
B. PEYRONEL, Torino - R. PEROTTI, Pisa - I. POLITI, Milano
P. RENCO, Milano - S. RICCARDO, Napoli - M. SACCHETTI, Bologna
O. VERONA, Firenze

DIRETTA DA
C. ARNAUDI Milano

O. Verona

Sullo stato di fase di AZOTOBACTER CHROOCOCCUM Beij

(Estratto dal fascicolo IV - V - VI - Vol. III Dicembre 1947)

Segretario di Redazione
V. TRECCANI

Direzione: VIA CELORIA, 2 - Amministrazione: VIA SALASCO, 4
MILANO

(ANN. MICR.)

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa

Sullo stato di fase di *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Beij.

O. Verona

E' noto, fin dalle prime descrizioni, come le colonie superficiali di *Azotobacter chroococcum* Beij. si presentino sotto vari aspetti. Jones (1) ad es. studiando l'aspetto colturale di A. c. in agar di Ashby fissò i seguenti quattro tipi:

« 1. Young surface colonies (1-2 days) at 25° C., having been plated from active growing cultures not more than seven days old, are transparent, colorees, moist, slightly, convex, entire, round and about 1 mm. di. When one week old, colonies that are not thickly seeded may be from 1-2 cm. diameter, raised, convex, smooth, white, semi-opaque, moist-viscid, glistening, the masses having a tendency to flow, giving irregularity in outline with an entire edge. Increase in size usually ceases after two to three wecks and a brown pigment is slowey developed like streaky clouds within the viscid mass. As the culture dries with age, the surface becomes irregularly contoured with broad depressions.

« 2. Surface colonies and streak cultures en Ashbys agar are at first very similar to those of 1. Later, however, they differ in that they have only a slight tendency to flow over the surface of the medium, being firmer or more pasty, the growth accumulating in a raised mass, with the surface coarsely contoured, more or less concentrically.

« 3. Surface colonies and streak cultures differ from 1 e 2 in being drier and pasty rather than moist and not having any tendency to flow but developing with upright edges into a raised mass, deeply and closely contoured on surface in a rugose manner, often radiating from centre-cultures at first white, soon turning brown then black.

« 4. Surface colonies and streak cultures have a somewhat similar development to those of 3, but differ in being smaller, more discreet, drier, frequently being cretaceous in texture, the surface becoming verrucose with fine indentations and the black pigment is produced carlier and is usually more intense ».

Nelle sue Memorie sulla Microbiologia del suolo Winogradsky (2), facendo uso di geli di silice distinse tre tipi di colonie: un tipo mucoso

(1) D. H. Jones: *A morphological and cultural study of some Azotobacter*. - « Centr. f. Bakt. », II Abt., vol. 38, p. 14, 1913.

(2) S. Winogradsky: *Étude sur la microbiologie du sol. - II. Sur le microbes fixateurs d'azote*. - « Ann. Inst. Pasteur », **40**, *455*, 1926.

(*colonies fluides*), uno secco e rugoso (*c. sèches*) ed uno mucoso-bombato e strutturato (*c. bombès*). Così, poco dopo, de Rossi (1).

Tale dualismo colturale, del resto continuamente confermato dalla comune pratica e fondamentalmente riferibile alle figure 1 e 3, 4 e 7 della Tav. I che accompagna il citato lavoro di Jones, dualismo che si estrinseca, peraltro, in maniere diverse in relazione anche alla formazione di pigmento, è certamente da porsi in rapporto allo stato di fase in cui si trova la specie nel momento in cui si procede al suo isolamento.

Quali siano tuttavia le caratteristiche di queste fasi non appare ben noto, per cui ci è sembrato di un qualche interesse procedere a qualche ricerca: sui risultati conseguiti qui brevemente si riferisce.

ISOLAMENTO DEI CEPPI

I ceppi sopra i quali sono state eseguite le presenti osservazioni sono stati isolati con il metodo di de Rossi che, come è noto, è inteso a sostituire il gelo di silice con l'agar. Tale metodo offre il vantaggio, rispetto a quello di Winogradsky, di una maggiore semplicità. Osservazioni, tuttavia, sono state effettuate anche su piastre al gelo pure presente quale sostanza energetica mannite. Il terreno proveniva da una parcella del campo sperimentale dell'Istituto. Le colonie sviluppatesi nelle varie serie di piastre erano ben riferibili ai tipi segnalati, in tutte le loro sfumature di aspetto, consistenza, mucosità, pigmentazione, ecc.; in altri termini, oltre a colonie in fase « S » e in fase « R » dichiarata, si rendevano visibili colonie in vario stadio di dissociazione (« SS-R », « S-R », « S-RR ») con prevalenza ora di uno ora di altro carattere dissociante.

Molte osservazioni furono effettuate direttamente; altre su colture trapiantate e mantenute su agar di Ashby. Per quanto si riferisce alla fase « R » le stesse osservazioni furono ripetute su varianti artificialmente provocate.

FATTORI STIMOLANTI LA DISSOCIAZIONE

Dal momento che nelle comuni piastre all'agar o al gelo mannitato compaiono promiscuamente colonie in vario stadio di dissociazione, è facile desumere come le singole cellule racchiudano già, al momento in cui si inizia il loro sviluppo colturale, elementi latenti di variazione. Quali, in Natura, siano i fattori di tale variazione difficile è precisare in quanto si ha ragione di credere siano numerosi e complessi. In primo piano stanno, probabilmente, alcuni che potremmo dire nutrizionali, dipendenti cioè dalla natura e concentrazione della sorgente energetica.

Le varie prove eseguite consentono ad es. di indicare nei mezzi mannitati, glucosati o saccarosati i mezzi più adatti al mantenimento delle

(1) G. de Rossi: *La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. - I: Isolement et dénombrement des « Azotobacters »* - « Boll. Sez. It. d. Soc. Int. di Micr. », **4**, *189*, 1932

forme in fase « S »; giacchè in tali mezzi non solo insorgono difficilmente, con il succedersi dei trapianti, fenomeni di variazione, ma gli stessi stipiti in fase « R », originari o provocati, tendono a passare e poi a fissarsi in fase « S » dopo un certo numero di passaggi. Nei mezzi colturali influisce tuttavia la concentrazione del materiale energetico. Nell'agar di Ashby la mannite è presente, come è noto, nella quantità del 20‰. Ove tale quantità si porti al 30-40-50‰ e si insista nei passaggi le patine tendono a farsi meno mucose e a incresparsi ai bordi.

Sostanze diverse da quelle, come la mannite, classicamente impiegate non mancano di esercitare la loro azione. Ciò appare ben noto anche dagli studi di Winogradsky (1). Infatti, come è stato confermato, trapianti effettuati in piastre con alcool etilico dànno patine che, pur mantenendosi mucose, si presentano meno abbondanti mentre morfologicamente le cellule si presentano più grandi e, spesso, in più frequenti forme involutive. In piastre al benzoato di sodio o di calcio si ha del pari uno sviluppo meno rigoglioso di colonie scarsamente mucose e secche; per esprimersi con le parole di Winogradsky: « le mucus n'y est pas si abondant, il n'y a plus de coulées, ni de confluences en flaques; il se fige plus vite et il brunit plus intensément ».

Quando si pensi che in Natura varie possono essere le sorgenti energetiche utilizzabili dagli azotobatteri chiaro è dunque di dover intanto attribuire ad esse, in quanto si dimostrano di influire sullo stato di fase, valore di fattore variante.

Del pari non si può disconoscere l'influenza delle sostanze azotate qualora esse siano presenti nel mezzo.

Colture in fase « S » trasportate e coltivate (sempre in agar di Ashby) in presenza di nitrato potassico e solfato ammonico 1-2-4‰ oppure di peptone 1-2‰ dànno con il succedersi dei passaggi segni evidenti di dissociazione.

Non diverso è il comportamento di fronte alla reazione e il fatto si inquadra entro quanto è noto sulla biologia di altri microrganismi. Nelle prove cui si riferisce sono stati coltivati ceppi in fase « S » in liquido di Ashby a pH 6, pH 7, pH 8. Periodicamente (ogni 2-3 passaggi) venivano allestite colture su agar al fine di mettere in evidenza l'insorgere di fenomeni di variazione. Essi, in modo più o meno evidente, comparvero sia nelle colture costantemente propagate in mezzo acido, sia in colture propagate alternativamente in mezzo acido (pH 6) e in mezzo alcalino (pH 8). L'azione dei sali, per qualità e quantità, è probabilmente vasta. Positivi reperti sono stati da noi ottenuti per mezzo del cloruro di sodio e del cloruro di litio.

Numerosi sono quindi i fattori di variazione registrati (natura e concentrazione dell'alimento energetico, presenza o meno di composti azotati, concentrazione idrogenionica del mezzo, presenza di sali) o ritenuti possibili (azione della temperatura, essiccamento, ecc.) in vitro. Tali, se non maggiori, debbono essere in Natura accompagnandosi agli stimoli di ordine fisico o chimico anche quelli di ordine biologico per il determinarsi di azioni

(1) S. Winogradsky: *Étude sur la microbiologie du sol. - V.° Mémoire.* - « Ann. Inst. Pastur », **48**, *89*, 1932.

di antagonismo con altre specie microbiche queste agenti direttamente o indirettamente a mezzo dei loro elaborati. Noi stessi abbiamo osservato, a questo riguardo, come ad es. estratti colturali di liquidi fungini inducano frequenti variazioni in molti comuni microbi del suolo (1).

CARATTERI E STABILITA' DELLE FORME VARIATE

Anche se, come è stato detto all'inizio, i vari caratteri delle colonie consentono di riferire queste, fondamentalmente, ai due classici tipi « S » ed « R », numerosi possono essere i cambiamenti che si manifestano durante il processo di spostamento di fase; giacchè, oltre alla strutturazione delle colonie, entra in giuoco variamente interferendo la produzione di muco e la produzione di pigmento. Il fatto appare evidente, più che attraverso l'esame degli strisci effettuati consecutivamente su agar di Ashby, nelle colture su piastra. Infatti, partendo da una colonia « R » delle piastre di isolamento, ove si insista nei passaggi in agar di Ashby si passa più o meno velocemente senza notare aspetti intermedi ben definibili alla fase « S »: gli strisci si fanno meno pigmentati, più mucosi e, via via, più lisci fino ad assumere l'aspetto tipico della fase « S ». Qualche volta è stato osservato che il passaggio ad « S » si manifesta deciso fin al primo passaggio. Qualora invece si segua il succedersi delle generazioni mediante colture per disseminazione su piastra è più facile definire stadi di variazione intermedia. Valga ad es. quanto è risultato dalla esperienza riassunta nel seguente schema in cui:

A - colonie in tipica fase « R »
[non mucose (secche), rugose, finemente strutturate, intensamente pigmentate].

AA - colonie in fase « R-S »
[mucose e lisce al centro, strutturate agli orli, pigmentate].

AAA - colonie in fase « R-S »
[non mucose (secche), rugose, non pigmentate].

AAAA - colonie in fase « R-S »
[mucose, debolmente strutturate, non intensamente pigmentate].

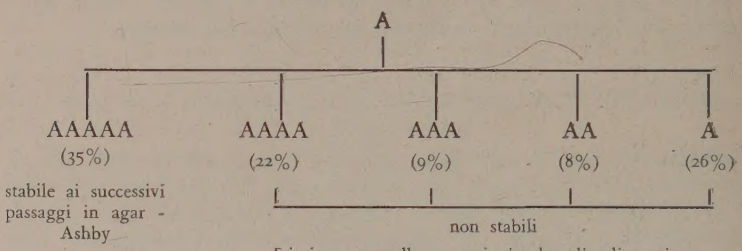
AAAAA - colonie in fase « S »
[mucose, lisce, scarsamente o tardivamente pigmentate].

Nello schema figurano le varie successioni colturali e sono indicate le percentuali di sviluppo; percentuali, peraltro, del tutto indicative alla singola esperienza perchè non riscontrate costanti:

---

(1) C. Verona: *Influenza di liquidi colturali fungini sullo sviluppo dei microbi del suolo.* - « Ann. d. Fac. Agraria dell'Università di Pisa », **7**, *147*, 1946.

da colonia in fase « R » isolata
da piastre al gelo e disseminata
in piastre all'agar di Ashby



[si ripetono, nelle successioni colturali, gli stessi quadri con la eliminazione di qualche aspetto e non nelle stesse percentuali; finalmente si arriva, in ogni caso, alla fase « S »].

I fatti non differiscono, fondamentalmente, quando sotto lo stimolo di un fattore dissociante si passi dalla fase « S » alla fase « R ». Rimarchevole, in questi casi, la necessità di non abbandonare lo stimolo salvo un ritorno più o meno brusco alla fase di partenza.

Ebbene, quali caratteri morfologici e fisiologici fanno riscontro a questi vari aspetti colturali? L'indagine non si è estesa ai vari tipi segnalati, ma è stata condotta solo su ceppi in fase « S » e in fase « R » dichiarata: per questa sono state tuttavia effettuate osservazioni sia sulle colonie che tali si presentavano nelle colture di isolamento, sia su ceppi sperimentalmente variati.

Aspetto colturale. Per questo non c'è che da richiamarsi a quanto è stato detto. Si soggiunge peraltro che nei ceppi in fase « R » lo sviluppo appare più lento. Per quanto si riferisce alla produzione di muco sappiamo che essa è anche influenzata dalla natura del substrato oltre ad essere in rapporto con il cambiamento di fase. La presenza di composti proteici tende ad es. a farla aumentare (1); ma i fatti sono correlativi in quanto un turbamento del regime alimentare stimola, come si è visto, la comparsa dei fenomeni di variazione. In merito alla produzione di pigmento la minore o più lenta produzione nei ceppi in fase « S » è evidente. Si hanno purtuttavia casi in cui alla fase « R » non corrisponde agli altri caratteri variati quello di una maggiore pigmentazione. Si osservano cioè colonie tipicamente rugose, ma non pigmentate o pigmentate solo a settori.

Aspetto morfologico. Il complesso dei caratteri morfologici è fondamentalmente diverso nelle due fasi. Ciò che anzitutto emerge è la presenza o assenza dell'involucro mucoso.

In fase « S » tale capsula appare voluminosa, spesso racchiudente due o più elementi morfologici; in « R » è sottile o, più generalmente, assente. Presenza di capsula e formazione di muco nelle colture sono fatti correlativi.

Associazioni cellulari non tipiche si riscontrano spesso in fase « S » rivelando l'esame batterioscopico ammassi irregolari o, al più, cellule

(1) Halmilton: « Journ. of Bacteriology », **22**, 1931.

disposte in corte catene; in fase « R » prevalgono invece raggruppamenti a tetradi o a sarcine. In quest'ultima fase si hanno anche più evidenti e numerose forme involutive. In fase « S » il movimento è più vivace; vero è anche che, in questa fase, le ciglia si mostrano assai più numerose e singolarmente più lunghe.

LA FISSAZIONE DELL'AZOTO IN RAPPORTO ALLO STATO DI FASE

Questo aspetto della questione è certo uno dei più importanti. Occorre però subito soggiungere che, almeno in rapporto alle esperienze eseguite, difficile è poter stabilire se la fissazione dell'azoto atmosferico si compia più intensamente in fase « S » o in fase « R ». Vale pertanto la pena, qui, di essere più dettagliati nella descrizione delle esperienze. Ecco come è stato proceduto.

Erlenmeyer da 1000 cc. contenenti 250 cc. di liquido di Beijerinck (contenente, come è noto, 20‰ di mannite) furono seminate in numero di tre con un ceppo in fase « S », numero tre con materiale in fase « R » prelevato da una piastra di isolamento [R_1], e numero tre con un ceppo in fase « R » ottenuto mediante passaggi in agar di Ashby al cloruro di litio [R_2]. Fu incubato per 40 giorni a 24-25° C. Al termine del 40° giorno, proceduto alla determinazione dell'azoto per mezzo della kindalizzazione, risultò:

	fase S		*fase R_1*		*fase R_2*	
	mgr. di N fissato per 1000 di soluzione	mgr. di N fissato per gr. 1 materia energet.	mgr. di N fissato per 1000 di soluzione	mgr. di N fissato per gr. 1 materia energet.	mgr. di N fissato per 1000 di soluzione	mgr. di N fissato per gr. 1 materia energet.
prova n. 1	130	6,5	140	7	150	7,5
prova n. 2	155	7,7	138	7	145	7,2
prova n. 3	120	6,0	165	8,2	128	6,4
media	135	6,7	148	7,4	141	7,0

La media dei dati ottenuti lascerebbe pensare che in fase « R » la fissazione si compia in modo più attivo. Ma le differenze, peraltro, sono così tenui che un'affermazione in questo senso appare piuttosto azzardata; tanto più quando si considerino partitamente i singoli dati ora maggiori in « S », ora in « R ». Perchè questo mancato deciso comportamento? Siccome siamo portati a ritenere che differenze nell'attività azotofissatrice pur debbono esistere in rapporto allo stato di fase, il motivo di questo incerto comportamento si pensa che debba risiedere in una certa instabilità dei caratteri di fase. Ciò ci fu dato di pensare in quanto, prelevata prima di procedere al dosaggio dell'azoto una piccolissima quantità delle vegetazioni apparse nei singoli matracci ed effettuate colture per disseminazione

su piastre allestite con agar di Ashby (e ciò allo scopo, appunto, di controllare la stabilità di fase) risultò la comparsa di colonie in fase « R » se pur in scarso numero, nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in fase « S » e viceversa.

Per questa ricerca il procedimento colturale seguito fu il seguente. Dopo aver ben agitato le diverse colture fu prelevato, con pipetta sterile, cc. 1 del materiale e diluito in cc. 1000 di acqua sterile. Agitato ripetutamente il recipiente di diluizione furono quindi allestite piastre inoculando di tale diluizione ciascuna di esse e in doppio cc. 0,5, cc. 0,2, cc. 0,1. A sviluppo avvenuto fu osservato:

— nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in S (medie):

colonie in S	82 %
» » SR (AA)	2 %
» » SR (AAAA)	4 %
» » R	12 %

— nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in R_1 (medie):

colonie in S	14 %
» » SR (AAA)	4 %
» » SR (AAAA)	6 %
» » R	76 %

— nelle piastre inoculate con materiale proveniente da colture in R_2 (medie):

colonie in S	10 %
» » SR (AAAA)	28 %
» » R	62 %

Il fatto non destò eccessiva sorpresa in quanto venne a ripetersi il quadro, fatte salve le percentuali dimostratesi sempre incostanti, già fissato in precedenza.

Ad ogni modo là dove predominano forme in fase « R » il processo di fissazione sembra dimostrarsi più attivo; tuttavia ciò non consente, come già è stato detto, alcuna decisa affermazione al riguardo.

IN QUALE FASE SI RINVENGONO GLI AZOTOBATTERI IN NATURA?

Qualora fosse stato possibile dimostrare una netta non trascurabile differenza, nel potere di azotofissazione, tra le due fasi « S » ed « R », interesse avrebbe avuto la ricerca intesa a stabilire in quale stato di fase si rinvengono gli Azotobatteri nel terreno; giacchè, prevalendo l'una o l'altra fase, diversa sarebbe stata la valutazione della importanza da attribuire a queste forme nel quadro della fissazione biologica dell'azoto in Natura. Vero è che la

prevalenza o meno dell'una o dell'altra fase si vede correlativa alle condizioni in essere dell'habitat, del resto quanto mai mutevole nei suoi fattori variamente influenti.

D'altronde, ad una visione esatta circa la prevalenza della fase « S » o della fase « R » non è possibile giungere in quanto, nella valutazione in oggetto, influisce sensibilmente e variamente il substrato. Ci si richiama ai dati raccolti nella seguente tabella:

	N.° di Azotobatteri per gr. 1 di terra (piastre allestite con il metodo di de' Rossi) presenti:							
	mannite				benzoato di sodio			
	colonie *S*	colonie *R*	colonie *SR*	totale	colonie *S*	colonie *R*	colonie *RS*	totale
1. Terreno di medio impasto a coltura (Pisa)	1.520	460	420	2.400	1.180	490	950	2.620
2. T. argilloso a coltura (Pisa) . . .	850	130	80	1.060	500	440	360	1.300
3. T. a riposo tendente all'argilloso (Pisa)	540	190	160	890	370	80	510	960
4. T. di medio impasto, prativo (Firenze)	1.050	150	70	1.370	620	190	400	1.210

Si scorge da tali dati che, ove si impieghi mannite, la prevalenza è per le forme in fase « S »; ove si impieghi invece benzoato di sodio la prevalenza non sempre è per tale fase: si modificano comunque i rapporti. Quale, delle due serie di dati, ci rappresenta l'aspetto reale? Ed inoltre: le colonie per es. repertate in fase « R » nelle piastre al benzoato di sodio è in tale fase che si trovavano in natura, oppure tali si sono manifestate nel singolare ambiente di isolamento? Difficile è dire.

CONCLUSIONI E DEDUZIONI

Le ricerche cui si è sommariamente riferito pongono in rilievo come il dualismo e, a volte, la pluralità di aspetto colturale registrata fin dalle prime descrizioni in *Azotobacter chroococcum* debba riportarsi al vario stato di fase ed inquadrarsi pertanto nel vasto fenomeno della dissociazione microbica.

Pur attraverso tipi diversi si individuano in modo ben netto le due fasi « S » ed « R » già note in numerosi altri microrganismi. L'una e l'altra fase risultano molto bene definite da un complesso di caratteri colturali e morfologici i principali dei quali, riassuntivamente, sono:

fase « S »	*fase « R »*
— colonie lisce, bombate, mucose, subtrasparenti, di più rapido sviluppo, meno intensamente pigmentate, facilmente confluenti;	— colonie circolari variamente strutturate, con aspetto di rosetta, secche, non mucose, opache, di più lento sviluppo, più intensamente pigmentate, con tendenza a rimanere isolate. In altri casi le colonie assumono aspetto intermedio. Se ne hanno di mucose pur presentanti lievi strutturazioni; altre, mucose al centro, presentano strutturazioni radiali agli orli; altre, rugose e secche, non presentano pigmento o lo presentano solo in corrispondenza di limitati settori.
— abbondante produzione di muco;	— scarsa o assente produzione di muco;
— presenza di capsula più o meno voluminosa;	— assenza di capsula;
— mobilità vivace; ciglia più numerose e più lunghe;	— più lenta mobilità; ciglia meno numerose e più corte;
— ammassi cellulari irregolari o corte catene;	— ammassi cellulari a tetradi o a sarcine;
— meno frequenti forme involutive;	— più frequenti forme involutive;
— meno intensa o più lenta formazione di pigmento;	— maggiore produzione di pigmento nelle varianti pigmentate;
— minore resistenza agli antisettici;	— maggiore resistenza agli antisettici;
— probabile minore attività azotofissatrice.	— probabile maggiore attività azotofissatrice.

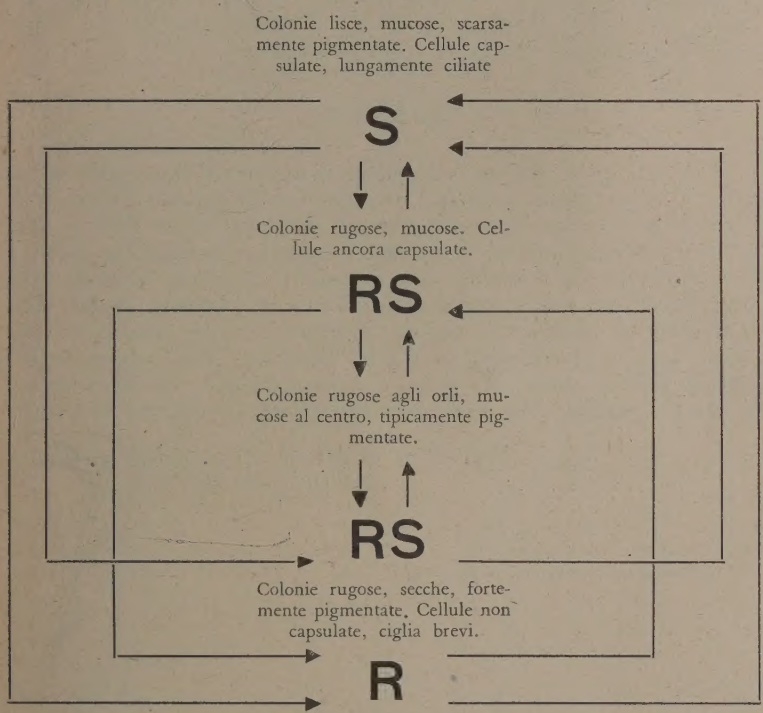
Ciò stabilito risulta chiaro come le varietà che alcuni Autori hanno distinto in seno alla specie, non sono che semplici aspetti dello stato di fase. Le varietà ad es. capsulate e non capsulate di Jones corrispondono, evidentemente, alla fase « S » e alla fase « R ». Del resto, revisioni fatte, sotto questo punto di vista, di altre specie microbiche hanno portato ad analoghe conclusioni. E' recente, al riguardo, uno studio di Puntoni (1) su *Bact. bulgaricum* del quale anche, per lo addietro, vennero distinte varietà oggi dimostrate essere il risultato di fenomeni dissociativi.

Forse, al lume di queste acquisizioni, cadrebbe opportuno rivedere non solo le diverse varietà, ma anche le varie specie o per lo meno quelle specie che hanno caratteri molto simili tra loro. C'è forte motivo di credere, ad es. che, *Azot Vinelandi* isolato da terre americane da Lipman nell'altro rappresenti che uno stato di fase di *Azot. agile* al quale, d'altronde, anche secondo Löhnis e Westermann (2) dovrebbe riferirsi.

(1) V. Puntoni: *Dissociazioni del bacillo bulgaro.* - « Ann. Micr. », **2**, *121*, 1942.

(2) F. Löhnis e T. Westermann: *Ueber stickstoffixierende Bakterien.* - « Centr. f. Bakt. », II, **22**, *234*, 1909 [questo ravvicinamento è peraltro discusso da Winogradsky in quanto in *Az. Vinelandi*, a differenza di *Az. agile*, si ha con il tempo una riduzione dimensionale degli elementi morfologici e un loro deciso incistamento].

Finalmente, la variabilità colturale e morfologica presentata da *Azotob. chroococcum* richiama latamente i vari cicli di sviluppo che sono stati elaborati per questa specie da Löhnis e Smith (1), da Petschenko (2) e, forse, da altri. Noi, pur senza entrare in merito alla questione, premesso tuttavia che non siamo portati a condividere l'opinione di Löhnis e degli altri, ammettiamo solo possibile un ciclo colturale con talvolta corrispondenti, ma non sensibilmente diversi aspetti morfologici:



Tale ciclo può svolgersi in un senso oppure in un altro; è comunque e semplicemente un ciclo trasformativo del tutto dipendente o in gran

(1) F. Löhnis e N. R. Smith: *Life cycles of the Bcteria.* - « Jour. of Agr. Res. », **6**, 675, 1916.

(2) B. v. Petschenko: *Ueber die Biologie, die Morphologie und den Entwicklungszyklus von Mikroorganismen der Azotobactergruppe.* - « Centr. f. Bakt. », II, **80**, 161, 1930.

parte dipendente da stimoli esterni (non conoscendosi la natura e il valore degli stimoli interni) e pertanto non riferibile al complesso e dubbio quadro della ciclogenesi (1).

RIASSUNTO

L'A. si sofferma nella descrizione dei vari aspetti colturali presentati da *Azotobacter chroococcum* Beij. Egli ritiene che tali aspetti altro non siano che manifestazioni dello stato di fase dimostratosi variare in rapporto a diversi fattori. Appare in conseguenza dubbia la definizione di particolari varietà e forse, sotto questo punto di vista, meritano anche di essere riviste alcune specie ritenute distinte da *Azot. chroococcum*.

RESUMÉ

L'Auteur, en se référant à des observations précédentes, s'arrête à décrire les divers aspects culturaux présentés par *Azotobacter choococcum*. Il retient que ces aspects ne sont que des manifestations de l'état de fase qui c'est démontré variable par rapport à plusieurs facteurs. Ces facteurs de variation ont été individués dans la nature et la concentration de l'aliment énergétique, dans la présence ou l'absence de substances azotées, dans la variation de concentration des ions hydrogène, dans la présence de sels, etc., y compris des stimulations d'ordre biologique. Vient ensuite la description des deux fases « S » et « R » et enfin quelques considérations sur la valeur à attribuer à ces deux fases par rapport à la fixation de l'azote.

Dall'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Pisa

(*Pervenuto in redazione il* 20-1-47).

---

(1) Un ciclo di natura genetica potrebbe forse ammettersi, ove fosse definitivamente dimostrata l'esistenza di forme filtrabili, limitatamente al passaggio dalla forma visibile alla forma invisibile. Vero è che nulla sappiamo circa il valore e significato genetico della fase filtrabile. D'altra parte sulla esistenza di tali forme filtrabili vertono discussioni nonostante positivi reperti registrati da Riccardo.

Cfr. Novogroudsky D. M. e M. Messineva: *The invisible forms of Soil Bacteria*. « Microbiology », vol. III, 1934 (cit. da Riccardo).

Novogroudsky D. M.: rec. in « Bull. Inst. Pasteur », **35**, *937*, 1937.

Riccardo S.: *Lo studio della microflora terricola insediatasi sulle lave vesuviane del* 1895-1899. - « Ann. Micr. », **2**, *135*, 1942.